

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①⑫ Off nlegungsschrift
①⑩ DE 43 21 033 A 1

⑤① Int. Cl. 8:
G 01 N 1/28
G 01 N 33/48
// C12Q 1/34, 1/42,
1/28, 1/30

②① Aktenzeichen: P 43 21 033.3
②② Anmeldetag: 24. 6. 93
④③ Offenlegungstag: 12. 1. 95

DE 43 21 033 A 1

⑦① Anmelder:
Weber, Georg, 35287 Amöneburg, DE

⑦② Erfinder:
Antrag auf Nichtnennung

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤④ Apparat zur vorteilhaften Durchführung histochemischer und immunhistochemischer Methoden sowie ein Verfahren zur Quantifizierung dieser Methoden
- ⑤⑦ Es wird eine Apparat zur vorteilhafteren Durchführung von immunhistochemischen und histochemischen Nachweisreaktionen sowie ein Verfahren zur Quantifizierung dieser Reaktionen beschrieben.

DE 43 21 033 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 94 408 062/41

15/29

Beschreibung

Antigene, Enzyme, mRNA oder DNA werden in Gewebeschnitten mittels immunhistochemischer oder histochemischer Reaktionen nachgewiesen. Hierbei werden Dünnschnitte von fixierten Geweben oder kryopräparierten Geweben auf Objektträger aufgebracht und mittels selektiver Reagenzien die nachzuweisende Struktur (Antigene, Enzyme, mRNA, DNA usw.) markiert. Die so markierten Strukturen können durch Verwendung bestimmter Amplifikationssysteme (Enzym-markierte Zweitantikörper kombiniert mit Farbstoffen, die nach enzymatischer Spaltung wasserunlöslich werden; Antikörper-Gold-Konjugate etc.) mikroskopisch sichtbar gemacht und semiquantitativ ausgewertet werden.

Bei der Durchführung dieser Methodiken treten eine Vielzahl technischer Schwierigkeiten auf, die im folgenden kurz dargestellt sind:

– Während der Durchführung immunhistochemischer oder histochemischer Reaktionen treten zwischen den verschiedenen Reaktionsschritten sehr häufig unerwünschte Verwaschungseffekte auf, bei denen Reagenzien, die für Gewebe 1 vorgesehen sind, auf Gewebe 2 und/oder Gewebe 3 desselben Objektträgers überdiffundieren.

Dieser unerwünschte Nebeneffekt kann nur dadurch vermieden werden, daß pro Objektträger nur eine Struktur nachgewiesen wird bzw. nur ein Gewebeschnitt aufgetragen wird.

– Die Nachweisempfindlichkeit für ein funktionell aktives Enzym wird in der Histochemie durch die Umsatzrate des Enzyms sowie seine Michaeliskonstante bestimmt. Um diese Enzymcharakteristika optimal zu nutzen, sollte das umzusetzende Substrat möglichst in Konzentrationen angeboten werden, die mindestens der Michaeliskonstanten entsprechen. Viele histochemische Substrate haben eine unzureichende Wasserlöslichkeit, so daß es nicht möglich ist, eine Substratkonzentration herzustellen, die der Michaeliskonstanten des Enzyms entspricht. Die Konsequenz hiervon ist eine suboptimale Substratkatalyse durch das Enzym, gefolgt von unzureichender Nachweisempfindlichkeit.

Dieser Nachteil läßt sich nur durch wiederholte Farbreaktion mit neuen Substratlösungen bzw. extrem langen Inkubationszeiten teilweise verbessern.

– Die Durchführung der Substratreaktion bei immunhistochemischen oder histochemischen Verfahren wird standardmäßig in Küvetten durchgeführt, die große Substratvolumina (> 20 ml) und mehrere Objektträger fassen.

Experimente, die verschiedene Substratreaktionen erfordern und unter Verwendung weniger Gewebeschnitte (Objektträger) durchzuführen wären, können somit nur ineffizient unter Verschwendung teuren Substrats durchgeführt werden.

Eine Vorrichtung, die die oben beschriebenen Unzulänglichkeiten behebt, ist zur Zeit kommerziell nicht erhältlich.

Im Rahmen unserer Arbeiten zur Verbesserung der Nachweisempfindlichkeit histochemischer Reaktionen ist es uns überraschenderweise gelungen, eine Apparatur zu finden, welche alle oben erwähnten Nachteile immunhistochemischer und histochemischer Verfahren behebt und zusätzlich die Möglichkeit eröffnet, immunhistochemische und histochemische Reaktionen unter Verwendung geeigneter Substrate zu quantifizieren.

Gegenstand der Erfindung ist also eine Apparatur zur vorteilhafteren Durchführung semiquantitativer immunhistochemischer bzw. histochemischer Verfahren sowie ein Verfahren, basierend auf der erfindungsgemäßen Apparatur zur Quantifizierung immunhistochemischer und histochemischer Nachweisverfahren.

Im folgenden wird beispielhaft eine erfindungsgemäße Apparatur genauer beschrieben. Sie besteht aus folgenden Bestandteilen (Abb. 1):

1. untere Komponente des Fixierungsteiles:

Polycarbonatplatte mit genau passender Aussparung für einen Klarsichtfeldobjektträger und mit vier eingelassenen Senkkopfschrauben,

2. Klarsichtfeldobjektträger (G. Menzel, Braunschweig),

3. Reservoirteil:

Silikondichtung mit zwölf ausgestanzten Reaktionsfeldern und zwei Orientierungsbohrungen,

4. obere Komponente des Fixierungsteiles:

Polycarbonatplatte mit zwölf Bohrungen, die einen Zugang zum Reservoirteil ermöglichen, vier Schraubbohrungen und zwei kurzen Orientierungsstäben,

5. Unterlegscheiben und Flügelmuttern.

Die oben genannten Bestandteile der beispielhaften Apparatur werden folgendermaßen zusammengesetzt (Abb. 2):

1. Der mit Gewebeschnitten bestückte Klarsichtfeldobjektträger wird mit der den Gewebeschnitten abgewandten Seite in die Aussparung auf der unteren Polycarbonatplatte (untere Komponente des Fixierungsteiles) gelegt (= untere Einheit).

2. Die Silikondichtung (Reservoirteil) wird mit Hilfe der Orientierungsbohrung im Reservoirteil sowie der Orientierungsstäbe in der oberen Komponente des Fixierungsteiles so auf die obere Polycarbonatplatte (obere Komponente des Fixierungsteiles) gelegt, daß die zwölf Bohrungen beider Teile genau übereinander passen (= obere Einheit).

3. Nun werden die untere Einheit und die obere Einheit mit Hilfe der eingelassenen Senkkopfschrauben der

unteren Polycarbonatplatte sowie der entsprechenden Schraubbohrungen in der oberen Polycarbonatplatte so aufeinander gelegt, daß die Silikondichtung auf der mit den Gewebeschnitten bestückten Seite des Klarsichtfeldobjekträgers liegt und die Gewebeschnitte auf den zwölf Reaktionsfelder des Objekträgers durch die entsprechenden zwölf Bohrungen der oberen Einheit zugänglich sind.

4. Zur Fixierung werden abschließend auf die vier Senkkopfschrauben der unteren Polycarbonatplatte, die nun durch die Schraubbohrungen der oberen Polycarbonatplatte reichen, Unterlegscheiben gelegt und die Apparatur mit vier Flügelmuttern fest angezogen, so daß das System flüssigkeitsundurchlässig wird.

In den Rahmen der Erfindung gehören ferner

— Apparaturen mit der Möglichkeit, auf einer Matrix mehr oder weniger als zwölf Gewebeschnitte zu bearbeiten.

— Dabei kann als Matrix für den oder die Gewebeschnitte außer einem Klarsichtfeldobjekträger auch eine Membran, z. B. aus Nitrozellulose, Polyvinylidendifluorid oder positiv geladenem Nylon in die erfindungsgemäße Apparatur eingebaut werden.

— Die Anzahl der in die erfindungsgemäße Apparatur einzubauenden Matrices ist nicht auf eins beschränkt: Je nach Anfertigung der Apparatur können beliebig viele Matrices in einer Apparatur parallel getestet werden. Dies ist besonders für Labore mit hohem Probendurchsatz in der Histo- und Immunhistochemie vorteilhaft.

Die erfindungsgemäße Apparatur bietet folgende Vorteile:

— Die Apparatur ist leicht zusammenbaubar und zerlegbar.

— Die Apparatur ist leicht zu handhaben und leicht zu reinigen.

— Die Apparatur ist nach der Reinigung wiederholt verwendbar.

— Gefrierschnitte können wie bisher leicht auf eine geeignete Matrix aufgebracht werden.

— Es können, je nach Ausführung der Apparatur, problemlos mehrere Gefrierschnitte auf derselben Matrix separat und gleichzeitig getestet werden:

Jede Kammer des Reservoirteiles um einen Gewebeschnitt ist flüssigkeitsundurchlässig (es findet kein Austausch von flüssigem Medium zwischen den Kammern statt). In der oben beispielhaft beschriebenen Apparatur z. B. können zwölf Gewebeschnitte parallel getestet werden.

— Das Reaktionsvolumen über dem Gewebeschnitt wird durch das Einspannen der Matrix in die Apparatur vergrößert.

— Der Verbrauch an Reaktionslösungen ist geringer (im Vergleich zu 20-ml-Küvetten).

— Reaktionslösungen können problemlos auch mit automatischen Mehrkanalpipetten aufgetragen und wieder entnommen werden.

— Die Erhöhung der Substratmenge durch das vergrößerte Volumen führt unerwarteterweise zu einer erhöhten Nachweisempfindlichkeit in histochemischen Tests.

— Die Verwendung der Apparatur ermöglicht, immunhistochemische und histochemische Nachweisverfahren zu quantifizieren.

Im folgenden soll an Beispielen die Überlegenheit der erfindungsgemäßen Apparatur gegenüber den herkömmlichen immunhistochemischen und histochemischen Techniken gezeigt werden.

1. Beispiel

Verbesserte Empfindlichkeit des histochemischen Nachweises der humanen lysosomalen β -Glucuronidase auf humanen Normalgeweben

Die erfindungsgemäße Apparatur entsprach bei diesen Versuchen der in **Abb. 1** gezeigten Version.

Gefrierschnitte der humanen Normalgewebe (Leber, Niere, Milz und Colon) wurden mit einem Kryostat (LEITZ, Wetzlar, Fabrikat 1720, Best.-Nr. 2530599) hergestellt. Die jeweils 6 μ m dicken Schnitte wurden auf die Reaktionsfelder der vorbehandelten Klarsichtfeldobjekträger (G. Menzel, Braunschweig) aufgebracht. Vor Gebrauch wurden die Gefrierschnitte ca. eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet.

Der histochemische Nachweis der humanen β -Glucuronidase in den Gewebeschnitten erfolgte nach der etablierten Methode von Murray et al. (Murray et al., J. histochem. cytochem., 1989, 37: 643—652):

Hexazotiertes Neufuchsin wurde hergestellt, indem 5 g Neufuchsin (SERVA, Heidelberg, Best.-Nr. 30293) in 100 ml 2N Salzsäure und 4 g Natriumnitrit in Aqua dest. gelöst wurden. Beide Lösungen wurden kurz vor Gebrauch jeweils im gleichen Verhältnis vermischt und filtriert. 0,2 M Natriumacetatpuffer, pH 5, wurde durch Mischen von 7 Teilen 0,2 M Natriumacetat mit 3 Teilen 0,2 M Essigsäure hergestellt. Für die Substratlösung, die auf die Schnitte aufgetragen wurde, wurden 2,8 mg Naphthol-AS-Bi- β -D-Glucuronid (SIGMA, München, Best.-Nr. 1875) in 10 ml 0,2 M Natriumacetatpuffer, pH 5, gelöst und anschließend 10 ml Aqua dest. sowie 0,6 ml frisch angesetztes hexazotiertes Neufuchsin dazugegeben.

Die histochemische Nachweisreaktion auf Kryogewebe wurde durchgeführt, nachdem die Gefrierschnitte ca. 60 min bei Raumtemperatur getrocknet waren. Die Substratlösung wurde aufgetragen (15 μ l pro Feld eines Klarsichtfeldobjekträgers, 100—300 μ l pro Feld bei Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur nach **Abb. 1**) und 90 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte für ca. 10 min in Aqua dest. gewaschen, bevor sie mit Hämalun (MERCK, Darmstadt, Best.-Nr. 9249) gegengefärbt und/oder

luftgetrocknet mit Aquatex (MERCK, Darmstadt, Best.-Nr. 8562) eingedeckelt wurden. Die so behandelten Gefrierschnitte wurden nun unter dem Lichtmikroskop (LEITZ, Wetzlar, Laborlux S) auf ihre β -Glucuronidase-Aktivität untersucht. Eine Kontrolle auf unspezifische Substratkomplex-Fällung wurde mit 10 mM pro Ansatz D-Saccharo-1,4-lacton (ALDRICH, Steinheim, Best.-Nr. 22.293-3), einem kompetitiven Inhibitor der β -Glucuronidase, durchgeführt.

Der Einfluß der Substratlösungsmenge auf die Nachweisempfindlichkeit wurde in parallelen Versuchsansätzen untersucht. Bei einer Substratkonzentration von 0,25 mM wurde die Substratlösungsmenge variiert. Sie betrug:

1. 15 μ l pro Feld eines Klarsichtfeldobjektträgers, Versuchsdurchführung auf dem Objektträger
2. 100 μ l pro Feld eines Klarsichtfeldobjektträgers, Versuchsdurchführung in erfindungsgemäßer Apparatur
3. 300 μ l pro Feld eines Klarsichtfeldobjektträgers, Versuchsdurchführung in erfindungsgemäßer Apparatur
4. > 300 μ l pro Feld eines Klarsichtfeldobjektträgers, Versuchsdurchführung in einer 100-ml-Waschküvette.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

- Eine Erhöhung der Substratlösungsmenge unter Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur führt zu einer deutlich sichtbaren Empfindlichkeitssteigerung des histochemischen Enzymnachweises: mit der Vergrößerung des Reaktionsvolumens steigt die Farbintensität.

- Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit oder eine Erhöhung der Substratkonzentration konnte eine weitere Optimierung des Nachweises nicht erzielt werden, da im ersten Fall eine störende Hintergrundfärbung auftrat (Background) und im zweiten Fall das Substrat bei höheren Konzentrationen (0,5–1 mM) nicht in Lösung blieb, sondern ausfiel.

2. Beispiel

- Quantifizierung histochemischer und immunhistochemischer Nachweisverfahren unter Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur

- Bei der Verwendung von geeigneten Substraten ist es möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Apparatur histochemische und immunhistochemische Nachweisreaktionen zu quantifizieren. Voraussetzung für diesen Reaktionstyp ist ein wasserlösliches Endprodukt, das in einem bestimmten Meßsystem nachweisbar und meßbar ist. Als nachzuweisende Strukturen kommen unter anderem tumorassoziierte Antigene, Rezeptoren und andere diagnostisch interessante Moleküle in Frage, wie z. B. CEA, Cytokeratin oder Östrogen-Rezeptor. Als Amplifikationsenzyme eignen sich z. B. alkalische Phosphatase, Peroxidase oder Katalase.

Das Prinzip ist folgendes:

- Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur kann das im Gewebeschnitt nachzuweisende Molekül mit den literaturbekannten histochemischen oder immunhistochemischen Nachweisreaktionen nachgewiesen werden. Wichtig ist nur, daß nach der Amplifikation statt eines wasserunlöslichen Produktes (Fällungsreaktion) ein wasserlösliches Endprodukt im Überstand entsteht, das eine meßbare chemische oder physikochemische Eigenschaft besitzt. Das konstante und bekannte Reaktionsvolumen über dem Gewebeschnitt, das die erfindungsgemäße Apparatur gewährleistet, ermöglicht es nun, das entstandene Endprodukt zu quantifizieren. Als Meßsysteme eignen sich je nach eingesetztem Substrat z. B. Fluorometer, Photometer, Chemilumineszenz- oder Elektrochemilumineszenzmeßgeräte etc. Die universelle Verwendbarkeit soll an einigen ausgewählten Beispielen gezeigt werden. Dabei wird zur Verdeutlichung die jeweilige Fällungsreaktion (qualitativer, mikroskopisch sichtbarer Nachweis) der entsprechenden quantifizierten Reaktion gegenübergestellt.

- a) Korrelation zwischen histochemischer und fluorometrischer Nachweisreaktion

β -Glucuronidase wurde unter Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur sowohl histochemisch als auch fluorometrisch in humanen Normalgeweben (Leber, Milz, Niere, Plazenta und Nebenhoden) nachgewiesen.

- Der histochemische Nachweis erfolgte wie unter Beispiel 1 bereits beschrieben.

- Bei der Quantifizierungsreaktion wurden die Gewebestückchen vor dem Schneiden der 6 μ m Schnitte auf ein quadratisches Format mit 5 mm Seitenlänge gebracht und statt des Fällungssubstrates Naphthol-AS-Bi- β -D-Glucuronid ein fluorogenes Substrat benutzt: 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronsäure (4-MUG) (SIGMA, München, Best.-Nr. 9130).

- Es wurden nach dem Lufttrocknen und Einspannen der Gewebeschnitte in die erfindungsgemäße Apparatur je 100 μ l 2,5 mM 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid, das in 200 mM Na-Acetat plus 0,01% BSA, pH 4,5, gelöst war, in die Reaktionsfelder pipettiert und für 2 Stunden bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach der exakten Inkubationszeit wurde die Reaktion mit je 150 μ l Stopplösung (0,2 M Glycin plus 0,2% SDS, pH 11,7) pro Reaktionsfeld abgebrochen. Anschließend wurden 200 μ l pro Reaktionsfeld in eine 96-well-Mikrotiterplatte (RENNER, Dannstadt, Best.-Nr. 12058) übertragen und im Fluoroskan II (FLOW LABORATORIES, Meckenheim, Best.-Nr. 78-611-00) gemessen.

Von allen Geweben wurden jeweils 6 Schnitte getestet.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 2 gezeigt.

Wie der Tabelle 2 deutlich zu entnehmen ist, besteht eine gute Korrelation zwischen dem histochemischen und dem fluorometrischen β -Glucuronidase-Nachweis auf Normalgewebe: starke, mikroskopisch sichtbare Färbung entspricht hohen gemessenen fluorogenen Einheiten, während Gewebeschnitte mit schwacher Färbung mit entsprechenden niedrigen Werten korrelieren.

Die erfindungsgemäße Apparatur ermöglicht es somit, histochemische Nachweisreaktionen zu quantifizieren.

Vergleichbare Ergebnisse werden mit erfindungsgemäßen Apparaturen erhalten, bei denen z. B. nur 3 Reaktionen pro Objektträger möglich sind oder mit erfindungsgemäßen Apparaturen, bei denen mehrere Objektträger pro Apparatur verwendet werden.

b) Korrelation zwischen immunhistochemischer und fluorometrischer Nachweisreaktion

Glykoproteine der Zellmembran lassen sich immunhistochemisch mit spezifischen monoklonalen Antikörpern differenziert lokalisieren und nachweisen. Normalerweise kann allerdings nur anhand der Farbintensität des Gewebeschnittes auf die Molekülanzahl zurückgeschlossen werden. Wenn aber das Endprodukt des Amplifikationssystems anstatt einer Fällungsreaktion und eines Farbniederschlags ein wasserlösliches Molekül mit einer meßbaren physikochemischen Eigenschaft ist, kann bei Verwendung der erfindungsgemäßen Apparatur eine immunhistochemische Nachweisreaktion quantifiziert werden.

Im folgenden Beispiel wurden die Glykoproteine CEA, PEM und NCAM in parallelen Ansätzen immunhistochemisch und fluorometrisch in der erfindungsgemäßen Apparatur in Tumorgewebeschnitten von Colonkarzinom, Mammakarzinom und kleinzelligem Lungenkarzinom nachgewiesen und quantifiziert.

Der immunhistochemische Nachweis wurde entsprechend der Methode von Cordell et al. (Cordell et al., 1984, J. histochem. cytochem., 32: 219 – 229) durchgeführt. Dabei wurden die 1. Antikörper in einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt. Als Zweitantikörper wurden anti-Maus-Ig-Antikörper, markiert mit alkalischer Phosphatase (SOUTHERN), in einer Verdünnung von 1 : 400 benutzt. Die Farbentwicklung erfolgte mit dem Substrat Naphthyl-AS-Phosphat plus hexazotiertem Pararosanilin.

Für die quantitative, immunhistochemische Nachweisreaktion wurden Tumorgewebeschnitte wie in Beispiel 2 beschrieben behandelt. Die Nachweisreaktion entsprach der oben angeführten immunhistochemischen Methode, allerdings wurde statt des Fällungssubstrates ein wasserlösliches, fluorogenes Substrat eingesetzt: 4-Methylumbelliferyl-phosphat. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurden, wie in Beispiel 2 bereits beschrieben, 200 μ l Reaktionslösung in eine 96-well-Mikrotiterplatte übertragen und im Fluoroskan II fluorometrisch ausgewertet.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle 3 wiedergegeben.

Die Daten in Tabelle 3 zeigen, daß eine gute Korrelation zwischen dem mikroskopischen, immunhistochemischen Nachweis und dem quantitativen, fluorometrischen Nachweis, erreicht durch das erfindungsgemäße Verfahren, besteht.

Tabelle 1

Optimierung des histochemischen β -Glucuronidase-Nachweises auf humanen Normalgeweben

ORGANE				
Substrat- lsg.-Menge (μ l)	Leber	Niere	Milz	Colon
=====				
15	+	+	+	+
100	++/+++	++	++	++
300	++/+++	++/+++	n.t.	+++
Küvette	+	+/++	+/++	n.t.
=====				
-/(+)/+/++/+++ : Klassifizierung nach steigender Farbintensität der Gewebeschnitte				
n.t.: nicht getestet				

Tabelle 2

Korrelation zwischen histochemischer und fluorometrischer β -Glucuronidase-Nachweisreaktion auf Normalgewebe

5

ORGAN

10

Reaktions-
stärke

Leber

Niere

Milz

Plazenta

Nebenhoden

=====

15

HISTO-
CHEMISCH,
mikrosko-
pische

20

Evaluierung

+++

+++

+

-

++++

FLUORO-

25

METRISCH,
fluorogene
Einheiten

30

(FU)*

110

95

43

9

242

=====

35

-(+)/+/++/+++: Klassifizierung nach steigender Farbintensität
des histochemischen Nachweises

*: fluorogene Einheiten (FU) als Zahlenwerte, wie im Fluoroskan II
bestimmt

40

45

50

55

60

65

DE 43 21 033 A1

Tabelle 3

Korrelation zwischen immunhistochemischen und fluorometrischen Nachweisreaktionen von Glykoproteinen in Tumorgewebeschnitten

NACHWEIS- REAKTION	GEWEBE	VERWENDETE MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN		
		CEA	PEM	NCAM
=====				
IMMUN- HISTO- CHEMISCH; mikrosko- pische Evaluierung	Colonkarzinom	+	-	-
	Mammakarzionom	-	+++	-
	kleinzelliges Lungenkarzinom	-	-	++

FLUORO- METRISCH, fluorogene Einheiten (FU)*	Colonkarzinom	120	4	6
	Mammakarzinom	9	450	2
	kleinzelliges Lungenkarzinom	15	21	260
=====				
-/(+)/+/++/+++: Klassifizierung nach steigender Farbintensität des Gewebeschnittes				
*: fluorogene Einheiten (FU) als Zahlenwerte, wie im Fluoroskan II bestimmt.				

Patentansprüche

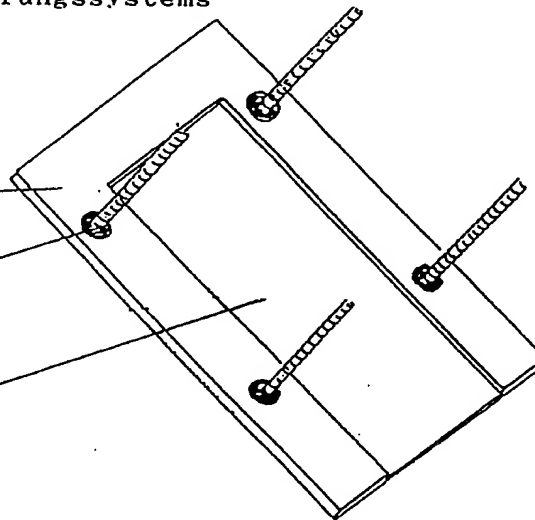
1. Apparatur, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus minimal einem Bestandteil zur vorteilhafteren Durchführung von Nachweisreaktionen auf Gewebeschnitten besteht.
2. Apparatur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einem Fixierungsteil und einem Reservoirteil besteht, wobei die Aufnahme mindestens einer Matrix, auf der die Gewebeschnitte fixiert sind, zwischen den beiden Teilen vorgesehen ist.
3. Apparatur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Fixierungsteil mindestens eine Öffnung hat, die einen Zugang zum Reservoirteil ermöglicht.
4. Apparatur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Fixierungsteil aus harten, inerten Materialien, wie z. B. Metall, Kunststoff, vorzugsweise Polycarbonat und der Reservoirteil aus weichen, inerten Materialien, wie z. B. Gummi, Kautschuk, weiche Kunststoffe, vorzugsweise Silikon, besteht.
5. Apparatur nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus den in Abb. 1 gezeigten Bestandteilen besteht.
6. Verfahren zur Quantifizierung von Nachweisreaktionen auf Gewebeschnitten, dadurch gekennzeichnet, daß die in Anspruch 1 beschriebene Apparatur verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Quantifizierung der Nachweisreaktion mittels wasserlöslicher Endprodukte, vorzugsweise fluorogenen Substraten, erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß es wie in Beispiel 2 beschrieben durchgeführt wird.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

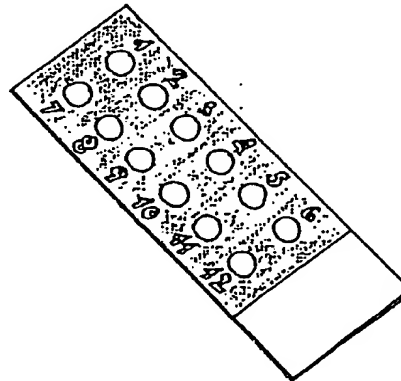
Abbildung 1: BESTANDTEILE EINER BEIPIELHAFTEN, ERFINDUNGSGENÄSSEN APPARATUR

1. Untere Komponente des Fixierungssystems

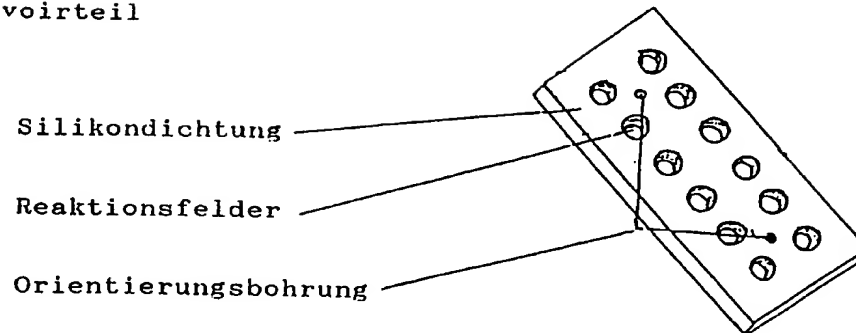
- (1) untere Polycarbonatplatte
- (2) Senkkopfschraube
- (3) Aussparung für Klarsichtfeldobjektträger



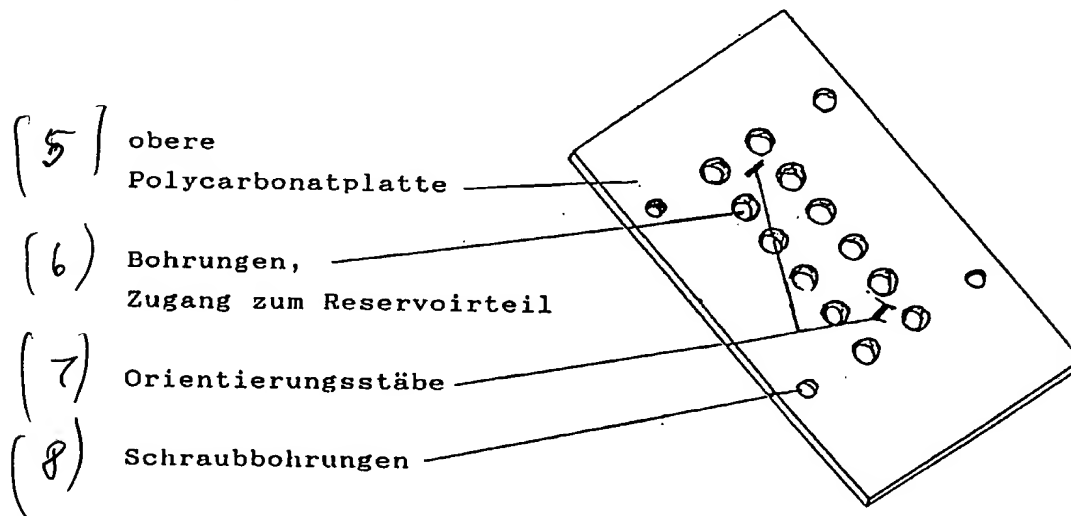
- (4) 2. Klarsichtfeldobjektträger



3. Reservoirteil



4. Obere Komponente des Fixierungsteiles



5. Flügelmuttern und Unterlegscheiben

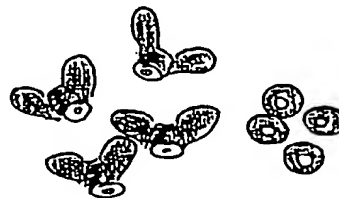
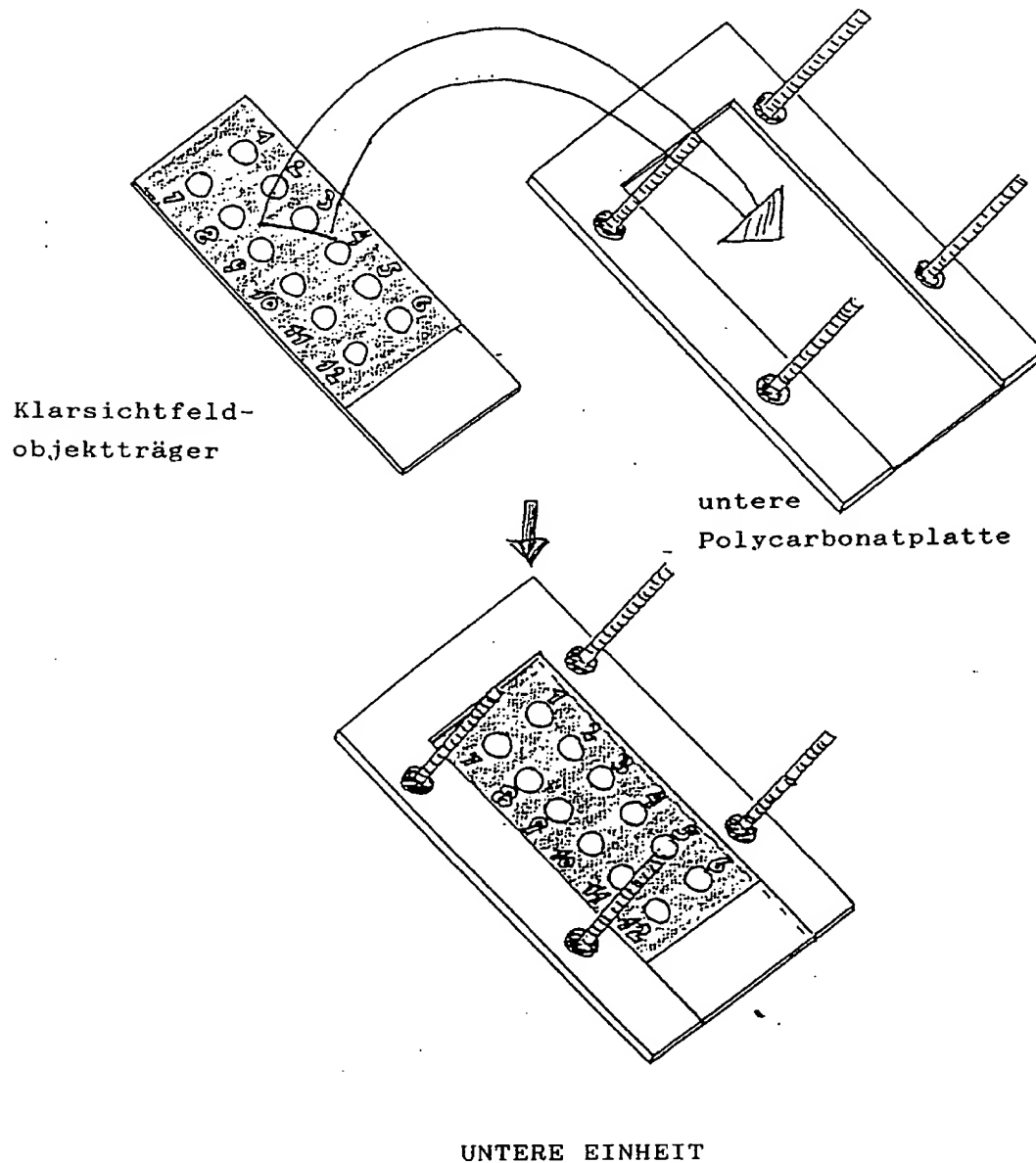
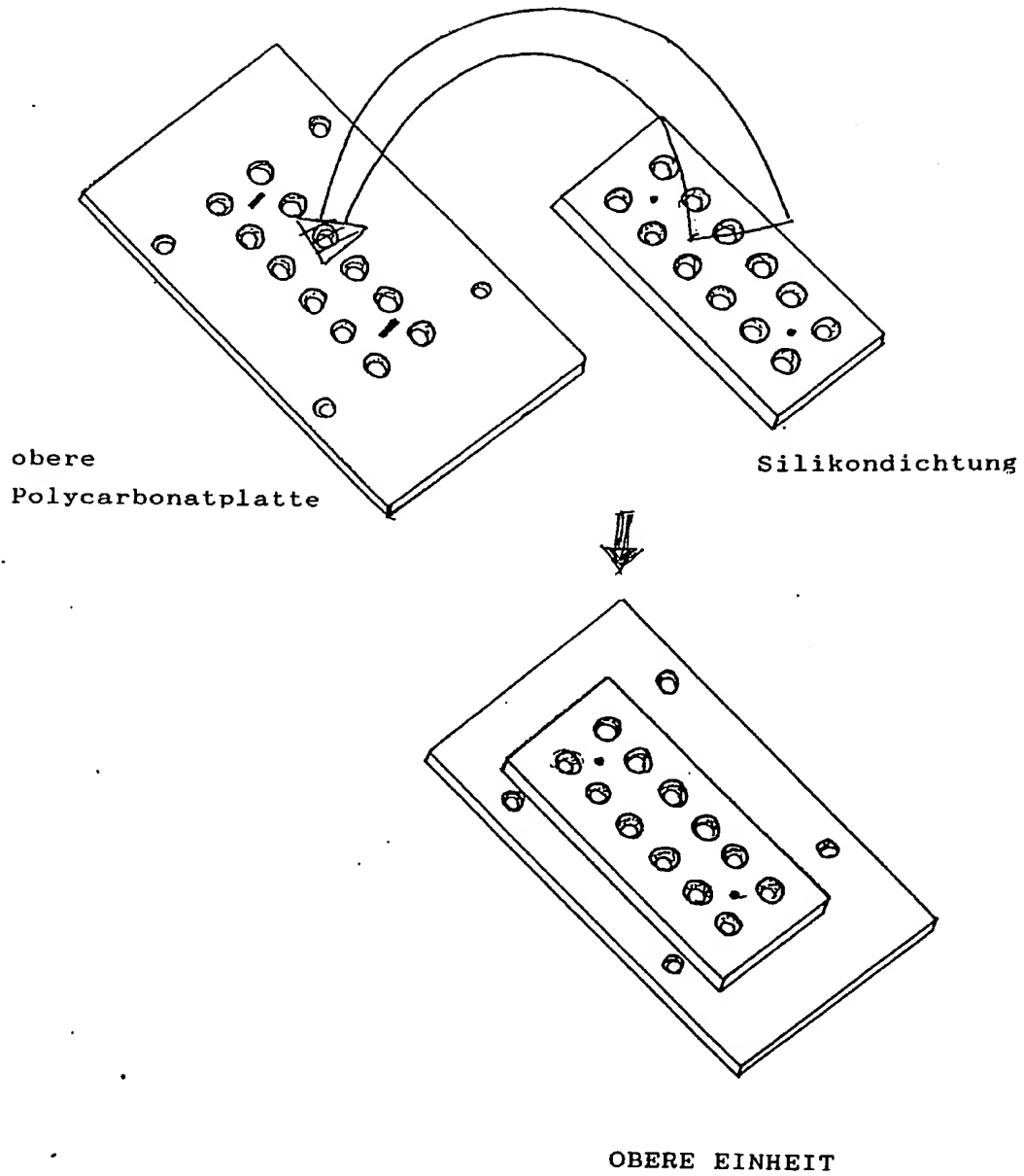


Abbildung 2: BEISPIELHAFTES ZUSAMMENSETZEN EINER ERFINDUNGSGEMÄSSEN APPARATUR, DIE AUS DEN IN ABBILDUNG 1 GEZEIGTEN BESTANDTEILEN BESTEHT

1. Schritt 1



2. Schritt 2



3. Schritt 3 und Schritt 4

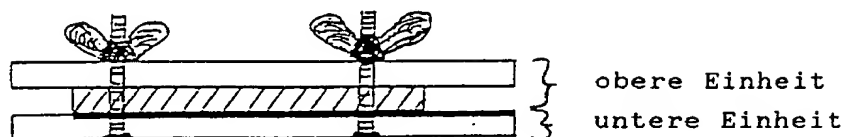
UNTERE EINHEIT

+

OBERE EINHEIT

+

Unterlegscheiben und Flügelmuttern



(Seitenansicht)